

Aus dem Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. G. G. Wendt

Methodische Untersuchungen über das Lp-System

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Hanfried Weigand
aus Aachen

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Methodische Untersuchungen über das Lp-System



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Hanfried Weigand

aus Aachen

Marburg 1967



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 8.5.1967

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan Prof. Dr. med. et Dr. med. dent. habil. H. Heuser

Referent : Prof. Dr. med. G.G. Wendt

Correferent : Dozent Dr. med. H. Cleve

VERZEICHNIS DER INHALTE

INHALT DER THEILE

1. Einleitung
2. Die Geschichte der Musik
3. Die Musiktheorie
4. Die Musikpraxis
5. Die Musikgeschichte
6. Die Musikästhetik
7. Die Musikpädagogik
8. Die Musikwissenschaft
9. Die Musiktherapie
10. Die Musik und die Gesellschaft
11. Die Musik und die Kunst
12. Die Musik und die Literatur
13. Die Musik und die Philosophie
14. Die Musik und die Religion
15. Die Musik und die Politik
16. Die Musik und die Wissenschaft
17. Die Musik und die Technik
18. Die Musik und die Medien
19. Die Musik und die Umwelt
20. Die Musik und die Zukunft



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554411_0045

METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS Lp-SYSTEM

Inhaltsverzeichnis:

- A. Einleitung
 - I. Literaturübersicht
 - II. Fragestellung
- B. Material und Technik
 - a) Serummateriail
 - b) Blutgewinnung und Aufbereitung
 - c) Immunisierungsmateriail
 - d) Tiere für die Immunisierung
 - e) Immunisierungskäfig
 - f) Lampe mit Drahtkorb
 - g) Glasplatten für die Ouchterlonytechnik
 - h) Herstellung des Vorratsagar
 - i) Natriumphosphatpuffer
 - j) Herstellung der Agarplatten
 - k) Stanzen der Platten
 - l) Fixierung der Platten
 - m) Färbung der Platten
 - n) Fotografische Wiedergabe der Platten
- C. Gewinnung und Beurteilung eines Lp-Antiserums
 - I. Immunisierung
 - II. Blutentnahme
 - III. Absorption
 - IV. Beschreibung der angewandten Doppel-Diffusionstechnik nach Ouchterlony

V. Test der gewonnenen Lp-Antiseren

- a) Beschreibung einer abgewandelten Testmethode
- b) Vorteile der abgewandelten Testmethode der Lp-Antiseren
- c) Beurteilung der gewonnenen Lp-Antiseren; Vergleich mit dem Lp-Antiserum von Berg.

VI. Wiederholte Immunisierung zur Verbesserung des Lp-Antiserums

- a) Immunisierung
- b) Blutentnahme
- c) Absorption
- d) Test der neuen Immunseren und ihre Beurteilung

D. Einzelheiten über das Verhalten des Lp-Präzipitates

I. Beobachtungen der Formvariationen des Lp-Präzipitates

- a) Identische Reaktion zur Darstellung schwacher Lp-Präzipitate
- b) Temperaturänderungen in der feuchten Kammer zur Darstellung schwacher Lp-Präzipitate nach Ouchterlony (1962)
- c) Lp-Test gealteter und verunreinigter Seren

II. Seltene Beobachtungen

III. Definition der Grenze zwischen Lp(a+) und Lp(a-)

E. Untersuchungen zur Häufigkeit des Phänotypen Lp(a+) und Berechnung der Genfrequenz

F. Familienuntersuchungen zur Frage der Vererbung des Lp(a)-Faktors

G. Diskussion

H. Zusammenfassung

I. Literaturverzeichnis

A. Einleitung

I. Literaturübersicht

Die Erforschung unterschiedlicher genetischer Eigenschaften der menschlichen Serumproteine begann 1955 durch Smithies. Er entdeckte drei genetisch verschiedene Haptoglobintypen im normalen menschlichen Serum.

1959 wurden ebenfalls auf Grund der unterschiedlichen Beweglichkeiten der Serumproteine im elektrischen Feld die Transferrintypen (Giblet, Hickman und Smithies. 1959) und das Gc-System (Hirschfeld, 1959) gefunden.

Seren einzelner Patienten mit chron. Polyarthritiden besitzen die Fähigkeit Blutkörperchen, die mit einem anti-D-Antikörper besetzt sind, zu agglutinieren. Ein Teil der Seren von gesunden Spendern sind in der Lage die Agglutination zu verhindern. Diese Beobachtungen führten zur Entdeckung des Gm- und des Inv-Systems (Grubb und Laurell, 1956).

Allison und Blumberg (1961) wandten die Doppeldiffusionstechnik im Agar (Ouchterlony, 1958) an, um zwischen verschiedenen genetischen Typen im Bereich des β -Lipoproteins zu unterscheiden.

Sie beschrieben ein Isopräzipitin im Serum eines Menschen, der an einer Anämie unbekannter Ätiologie litt und annähernd 50 Bluttransfusionen erhalten hatte. Serum dieses Patienten zeigte in der Ouchterlony-Technik mit einer bestimmten Anzahl (55 %) normaler gesunder Seren ein Präzipitat. Genfrequenz-Familien- und Zwillingsuntersuchungen ergaben, daß dieser Serumfaktor genetisch fixiert ist. Allison und Blumberg nannten ihn Ag (a)-Faktor und unterschieden zwischen den Phänotypen Ag (a+) (Genotypen: $Ag^a Ag^a$ und $Ag^a Ag^-$) und den Phänotypen Ag (a-) (Genotyp: $Ag Ag^-$).

1963 gelang es Blumberg auf dem gleichen Wege im β -Lipoprotein eines "polytransfundierte" Serums (eines Patienten mit Cooley-Anämie), einen weiteren erblichen Faktor zu identifizieren und gegen den Ag(a)-Faktor abzugrenzen. Er nannte ihn Ag(b). Die Genfrequenz liegt weit über der des Ag(a)-Faktors.

Angeregt durch die Untersuchungen von Blumberg, befaßte sich K. Berg ebenfalls mit dem Problem der Antikörperbildung im menschlichen Serum.

1963 berichtete er über einen neuen erblichen Polymorphismus im Bereich des β -Lipoproteins des menschlichen Serums, den er "Lp" nannte.

Berg ging von der Voraussetzung aus, daß die Möglichkeit besteht, zwischen genetisch verschieden determinierten Serumtypen zu unterscheiden, indem man versucht, durch geeignete Immunisierungs- und Absorptionsverfahren einen spezifischen Antikörper in Form eines Antiserums freizustellen.

Auf der Suche nach einem geeigneten Antigen, fiel die Wahl auf das menschliche β -Lipoprotein, da in diesem Bereich ja bereits Blumberg und Allison (1961) und Blumberg (1963) der Nachweis eines Polymorphismus gelungen war. Außerdem bereitete die Isolation größerer Mengen dieses Proteins keine allzugroßen Schwierigkeiten.

Das als β -Lipoprotein bezeichnete Protein ist identisch mit dem a-2-Lipoprotein, das über die Immunoelktrophorese dargestellt worden ist. (Crowle, 1961, p. 96) und dem "Low-density-lipoprotein" in der Ultrazentrifugenaufbereitung (Cramer, 1962).

Die β -Lipoproteinfraktion wurde auf dem Wege der schrittweisen Elutionstechnik über eine Hydroxylapatit-säule gewonnen, so wie sie Hjerten (1959) beschrieb.

Eine Dialyse dieser Fraktion gegen physiologische NaCl beendet den Gewinnungsprozeß der Immunisierungssubstanz.

Mit diesem Antigen immunisierte Berg Kaninchen (ca. 3,5 kg Gewicht) über einen Zeitraum von vier Monaten in regelmäßigen Abständen.

Die Tiere lieferten Immunseren, die er mit menschlichen Vollseren und isoliertem β -Lipoprotein absorbierte.

Auf diese Weise erhielt er Antiseren.

Diese Antiseren ließ er auf verkleinerten Ouchterlonyaschen gegen menschliches Vollserum und gereinigtes β -Lipoprotein diffundieren.

Bildet sich dabei zwischen dem Antiserum und den zu untersuchenden Seren ein Präzipitat, so konstatierte Berg eine positive Reaktion (Lp (a+)).

Das Ergebnis der von Berg angestellten Immunisierungs- und Absorptionsversuche, läßt sich nachträglich kurz zusammenfassen:

Benutzt man zur Herstellung der β -Lipoproteinfraktion das Blut eines Lp (a+) Menschen, und absorbiert man das gewonnene Kaninchenrohserum mit dem Serum eines Lp (a-) Menschen, so kann man ein spezifisches Anti-Lp-Serum erhalten.

Die Spezifität eines Antiserums ist sehr von dem Mischungsverhältnis zwischen Immunserum und Absorptionsserum abhängig. Ist zum Beispiel das Mischungsverhältnis sehr zu Gunsten des Immunserums verschoben, so können nach der Diffusion sowohl gegen ein Lp (a+) als auch gegen ein Lp (a-)-Serum Präzipitate beobachtet werden, die jedoch völlig unspezifisch sind, und gewissermaßen eine nachträgliche Absorption des überschüssigen Immunserums darstellen.

Berg hat mit der β -Lipoproteinfraktion verschiedener Personen eine größere Zahl von Kaninchen immunisiert. Die dabei gewonnenen Kaninchen-Antiseren hat er durch Variation der Menge des $Lp(a-)$ -Serums bei der Absorption jeweils so einstellen können, daß die absorbierten Seren jeweils die gleichen Personen übereinstimmen^d in $Lp(a+)$ und $Lp(a-)$ Personen unterschieden.

Eine vergleichende Untersuchung ergab, daß der von Berg mit seiner Methode erfaßte Anteil der β -Lipoproteinfraktion nicht mit dem Ag-Faktor identisch ist.

So erhielt der neue Proteinfaktor die Bezeichnung:

$Lp(a)$ - Faktor.

Seren, in denen der $Lp(a)$ - Faktor vorhanden ist, werden $Lp(a+)$, solche, in denen er nicht vorhanden ist, werden $Lp(a-)$ bezeichnet.

Untersuchungen zur Häufigkeit des $Lp(a)$ - Faktors führte Berg an 314 erwachsenen, gesunden und nicht miteinander verwandten Personen durch.

107 Personen = 34,08 % zeigten sich als $Lp(a+)$,

207 " = 65,92 % " " " $Lp(a-)$.

Daraus ergibt sich eine Genfrequenz für $Lp(a-) = 0,8119$

für $Lp(a+) = 0,1881$.

Untersuchungen an 23 Familien legten die Vermutung nahe, daß die Vererbung des $Lp(a)$ - Faktors durch ein Genpaar Lp^a und Lp^d autosomal - dominant erfolgt. Diese Theorie wurde durch spätere Untersuchungen von Berg und Mohr (1963) unterstützt.

Es ergibt sich folgendes Erbschema :

Erscheinungsbild :	Erbbild :
$Lp(a+)$	$Lp^a Lp^a$ oder $Lp^a Lp^d$
$Lp(a-)$	$Lp^d Lp^d$

In der Diskussion dieser ersten Arbeit über das Lp -System erwähnt Berg den Versuch, ein antithetisches Anti-serum über eine Immunisierung mit einem Serum eines $Lp(a-)$ Menschen zu gewinnen.

Ebenso wie die Versuche von Blumberg, Dray und Robinson (1962) ein antithetisches $Ag(a)$ - Antiserum herzustellen, fehlschlagen, blieben auch diese Experimente erfolglos.

In der folgenden Zeit hat sich Berg bemüht, durch zahlreiche spezielle Experimente, die Methodik der Lp -Bestimmung zu überprüfen, die Ergebnisse abzusichern und neue hinzuzufügen.

Vergleiche mit anderen genetisch fixierten Serumfaktoren tragen dazu bei, die Eigenständigkeit des Lp -Systems zu sichern.

Mohr und Berg (1963) berichten über Versuche an einem Serummaterial von 92 Familien mit 305 Kindern, mit der Zielsetzung, Korrelations- und Koppelungsbeziehungen des Lp -Systems mit anderen genetischen Systemen aufzudecken. Dabei wurden folgende Merkmale berücksichtigt :

ABO, MN Ss, Rh, Le, Lu, P, Fy, K, Jk, Gm, Gc und Hp.

Auffällig erschien lediglich die Beziehung von Gc (1-1) zu Lp (a) :

$$\chi^2 = 6,507$$

1963 fanden Berg und Wendt an einem Serummaterial von 150 gesunden nicht blutsverwandten Personen zwischen Gc (1-1) und Lp (a) einen Wert für $\chi^2 = 5,048$. Das unterschiedliche Serummaterial läßt jedoch keine entscheidende Schlußfolgerung zu. Alle übrigen Vergleiche ergaben keinen signifikanten Hinweis auf eine Koppelung oder Korrelation.

Die enge Nachbarschaft des Lp-Systems zum Ag-System innerhalb derselben Proteinfraction, veranlaßte Berg (1964 a) zu weiteren Experimenten.

Alle Ergebnisse bestätigten, daß keine unmittelbare Beziehung zwischen beiden Serumproteinen besteht.

Immunologische Tests ergaben, daß alle Kombinationen zwischen dem Lp (a) - und dem Ag (a) - Faktor innerhalb eines menschlichen Serums möglich sind. In der Doppeldiffusionstechnik ließ sich eine "non identical reaction" nachweisen. Die Präzipitate beider Faktoren überschneiden einander in benachbarter Position.

Die Absorption eines Anti-Lp (a) - Serums mit einem menschlichen Serum vom Typ Lp (a -) Ag (a +) war nicht in der Lage, die Lp (a) - Antikörper zu eliminieren. Ebenso blieben die Antikörper eines Ag (a) - Antiserums nach einer Absorption mit einem Serum vom Typ Lp (a +) Ag (a -) erhalten.

Ein weiterer Unterschied beider Systeme ließ sich durch den Nachweis aufzeigen, daß beide Faktoren auf verschiedenen Molekülen lokalisiert sind. Ein Serum vom Typ Lp (a+) Ag (a+) war durchaus fähig, mit einem Ag (a) - Antiserum zu reagieren, nachdem es zuvor bereits mit einem Lp (a) - Antiserum präzipitiert hatte. Umgekehrt reagierte dasselbe Serum mit einem Anti-Lp (a) - Serum, wenn es zuvor mit einem Anti-Ag(a) - Serum ein Präzipitat gezeigt hatte.

Die Zahl der Familien, die eine Koppelungsuntersuchung zwischen Lp (a) und Ag (a) zuließen, ist zu gering, um eine endgültige Schlußfolgerung ziehen zu können. Ein Anhalt für derartige Beziehungen ist jedoch vorerst nicht gegeben.

Im Gegensatz zu der Haltbarkeit des Ag (a) - Faktors, scheint der Lp(a) - Faktor wesentlich empfindlicher zu sein.

Drei weitere Arbeiten von Berg geben Auskunft über die immunologischen Probleme des Lp-Systems und die Reaktionsweise zwischen menschlichem Serum vom Typ Lp (a+) und dem Kaninchen - Lp (a) - Antikörper.

Die Immunelektrophorese bestätigte die Lokalisation des Lp-Faktors im Bereich des β -Lipoproteins als separate, antigene Komponente. Versuche, in denen eine 7S-Globulinfraktion als Inhibitor beobachtet werden konnte, führten zu der Schlußfolgerung, daß der Lp (a) - Antikörper der 7S-Globulinfraktion des Kaninchenimmunserums angehört. (Berg 1965 b).

Interbasin und Intragel-absorptionen bewiesen, daß sich die Lp-Aktivität auch ohne vorherige Absorption des Immunserums in Reagenzgläsern darstellen läßt.

In zahlreichen Experimenten hat Berg versucht, die jeweils besten Bedingungen für die Gewinnung des Lp (a) - Antiserums und zur Darstellung des Lp-Präzipitates herauszufinden (Berg 1965 a, b, 1964 c, d). Er stellte dabei folgendes fest :

Menge und Konzentration des Antigens im Immunisierungsmaterial sind ausschlaggebend für die Intensität der Antikörperbildung.

Schon bald hatte Berg begonnen, außer einer gereinigten β -Lipoproteinfraktion eines Lp (a +) Spenders, menschliches Vollserum des gleichen Typs zur Immunisierung zu verwenden. Die gewonnenen Immunsereen wurden mit einem entsprechenden menschlichen Vollserum vom Typ Lp (a -) absorbiert. Es resultierte ein Lp (a) - Antiserum, das sich in seiner Wirksamkeit nicht von den bisherigen Anti-Lp-Seren unterschied (Berg 1965 a). Auf diese Weise wurde die Herstellung des Lp (a)- Antiserums wesentlich erleichtert.

Der Zusatz von Freund's Adjuvants zum Immunisierungsmaterial zeigte keine besondere Wirkung (Berg 1965 a).

Um die Immunisierung technisch zu erleichtern und herauszufinden, auf welche Wege und wo die Kaninchen die Antikörper bilden, spritzte Berg das Antigen einigen Kaninchen vergleichsweise intramuskulär. Die Kaninchen bildeten keine Antikörper. Sowohl bei der Immunisierung als auch bei der nachfolgenden Absorption ist die Verwendung von gepoolten Seren möglich (Berg 1965 a).

Zur Steigerung des Antikörpertiters im Antiserum führte Berg eine Reimmunisierung bei einigen Kaninchen durch, die bereits vor einigen Monaten nach einem vollen Immunisierungsprogramm ein wirksames Lp(a)-Antiserum geliefert hatten. Die Reimmunisierung dauerte nur eine Woche

(mit drei Injektionen). Sieben Tage später folgte die Blutentnahme. Ein Vergleich der Antiseren ließ die Reimmunisierung zur Steigerung des Antikörpertiters nicht bedeutsam erscheinen (Berg 1965 a).

Bei der Durchführung des Lp-Tests zeigte sich, daß starke Verunreinigungen der zu untersuchenden Seren, die Ergebnisse beeinträchtigen. Besonders schwierig erwiesen sich die Untersuchungen an hämolytischen Seren. Es entstanden auf der Ouchterlonyplatte dichte, ringförmige Schleier, die eine genaue Ablesung der Präzipitate in Frage stellte. Um diese fraglichen Ergebnisse abzusichern, setzte man diese Seren in Parallelversuchen zunächst der Elektrophorese aus. Auf diese Weise ließen sich die hämolytischen Verunreinigungen und das β -Lipoprotein voneinander trennen. (Das β -Lipoprotein wandert dem positiven, die hämolytischen Substanzen dem negativen Pol entgegen..) Erst nach dieser Auftrennung folgte auf der gleichen Platte der Lp-Test. Beide Verfahren ergaben eine volle Übereinstimmung der Ergebnisse (Berg und Mohr 1963). Dieses Verfahren ist recht aufwendig und zeitraubend. Daher erscheint es sehr wichtig, alle Seren sorgfältig aufzubereiten und möglichst bald zu bestimmen.

Durch systematische Vergleichsuntersuchungen ließen sich für die Stabilität des Lp (a) - Faktors maximale Schwankungsbreiten und optimale Bedingungen für die Durchführung des Lp-Tests herausfinden (Berg 1964 d, 1965 b).

Mehrfaches Einfrieren und Auftauen führt nach einigen Monaten zur Einschränkung und schließlich zum Verlust der Reaktionsfähigkeit mit dem Lp (a) - Antiserum.

Der Zusatz von Merthiolat als Bakteriostatikum in einer Konzentration von 1/10 000 verhindert eine vorzeitige Trübung der Seren, ohne die Reaktion merklich zu beeinflussen. Aber auch diese Seren verlieren nach einigen Monaten ihre Fähigkeit mit Lp (a) - Antikörper zu reagieren.

Die Aufbewahrung bei -25°C hat sich als günstig herausgestellt. (Der Ag (a) - Faktor läßt sich vergleichsweise über mehrere Jahre unversehrt aufbewahren (Berg 1964 d)).

Lp (a+) Seren können bis zu 60°C erhitzt werden ohne ein verändertes Präzipitat zu zeigen. Nach einer Erhöhung der Temperatur auf 70°C lassen sich keine Präzipitate mehr nachweisen (Berg 1964 c).

Wurden zu untersuchende Seren und das Anti-Lp (a) - Serum bis zu 65°C für 30 Minuten erhitzt, und damit das Komplement beider Seren zerstört, so konnte kein Unterschied im Verhalten zu unbehandelten Seren beobachtet werden. Demnach scheint das Komplement für die Entwicklung des Lp-Präzipitates nicht von Bedeutung zu sein (Berg 1964 d).

Der pH-Wert im Agargel der Ouchterlonyplatten erlaubt in einer Schwankungsbreite von 5,0 bis 8,6 den Nachweis eines Lp-Präzipitates. Die besten Ergebnisse erhält man jedoch bei einem pH von 7,0 bis 8,0.

Gleichzeitig empfiehlt sich nach Berg's Erfahrungen eine Agarkonzentration von 1,0 oder 1,5 (Berg 1964 d).

Schon in der zweiten Arbeit über das Lp-System (Genetics of Lp-system, Berg und Mohr 1963) tauchte ein besonderes Problem auf, das in der weiteren Forschung unterschiedlich bewertet und gedeutet wurde.

Berg hatte zunächst ganz klar zwischen Lp (a+) und Lp (a-) unterschieden, wenn er auch häufig verschieden stark ausgeprägte Lp-Präzipitate fand.

Weak - reaktion, so nennen Berg und Mohr (1963) das Verhalten einiger Seren vom Typ Lp (a+), die nur ein schwaches Präzipitat zeigen. Damit war die Frage nach den Intermediärtypen aufgeworfen.

Diese Seren jedoch gehörten fast ausschließlich dem Material an, das über eine Blutentnahme aus dem Ohrläppchen (Kappilarblut) gewonnen worden war. Die Autoren waren der Meinung, daß man zwar zwischen schwach positiven und stark positiven Präzipitaten unterscheiden könne, der Unterschied aber nicht so scharf begrenzt sei und alle Präzipitate oberhalb der Sichtbarkeitsgrenze liegen. Aus diesem Grunde erschien eine Aufgliederung der Lp (a+) reagierenden Seren in einzelne Intermediärtypen nicht erforderlich.

Das Problem der starken und schwachen Reaktionen, das auch in anderen Veröffentlichungen anklingt, wurde von W. Renninger, G.G. Wendt, P. Nawrocki und H. Weigand zum Gegenstand spezieller Untersuchungen gemacht.

Wir gingen dabei von der Beobachtung aus, daß sich zwischen eindeutig positiven und eindeutig negativen Reaktionen eine Reaktion mittlerer Stärke unterscheiden und reproduzieren läßt.

Die anfängliche Hoffnung, daß mit den schwachen Reaktionen die Heterozygoten erfaßt werden, ließ sich bei Familienuntersuchungen nicht bestätigen. Obwohl es möglich ist, die bisher vorliegenden Befunde mit

einem Drei-Allelen-Modell zu erklären, sind wir dennoch nicht überzeugt, daß der Typ Lp (a - schwach +), den wir als Lp (as+) bezeichnet haben, genetisch bedingt sein muß. Wir glauben vielmehr eher, daß von Lp (a -) bis Lp (a+) kontinuierliche quantitative Unterschiede bestehen.

Eine Reihe von Ergebnissen scheint dies zu bestätigen. Im Vordergrund stehen erhebliche, und zum Teil statistisch gesicherte, Unterschiede in der Häufigkeit der Lp (a) - Typen in Abhängigkeit von verschiedenen Krankheiten (W. Renninger, G.G. Wendt, P. Nawrocki und H. Weigand) und (G. Jörgensen, H. Dengler und U. Hopfer).

Sowohl eine erhöhte als auch eine erniedrigte Phänotypen-Häufigkeit für Lp (a+) wurde beobachtet :

Nierenerkrankungen, Diabetsmellitus und Herzinfarkte wiesen eine besondere Häufung der Lp-Typen auf, während bei Kranken mit Neurodermitis und Leberschäden der Lp (a) - Faktor weniger häufig zu finden war.

In diesem Zusammenhang ist eine Arbeit von D.M. Kahlich-Koenner und G. Weipel erwähnenswert (1965).

In dieser Arbeit wurden 258 Seren auf ihren Gehalt an β -Lipoprotein und ihr Verhalten im Lp-System überprüft. Der Normalgehalt eines Serums an β -Lipoprotein liegt bei 200 - 300 mg%. Bei den untersuchten Seren zeigten die Lp (a+) mit einer β -Lipoproteinkonzentration von durchschnittlich 255,2 mg% gegenüber den Lp (a-) mit durchschnittlich 217,9 mg% eine signifikante Differenz.

Alle diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß möglicherweise eine krankheitsabhängige Veränderung der Serumproteine auch im Bereich der β -Lipoproteine zu einer unterschiedlichen Präzipitationsreaktion im Lp-System führt.

Lp-Untersuchungen verschiedener Altersgruppen deuten daraufhin, daß die Häufigkeit des Lp-Faktors bei Erwachsenen höher ist als bei Jugendlichen (Renninger, Wendt, Nawrocki, Weigand 1965).

Alle Familienuntersuchungen konnten die Theorie des autosomal-dominanten Erbganges (Berg 1963 und Berg und Mohr 1963) nicht widerlegen. In der Diskussion der Arbeit von Berg und Mohr (1963) wird von einer Ausnahme berichtet, die diesem Erbmechanismus nicht entspricht. Nach umfangreichen serodiagnostischen Untersuchungen wurde das Serum eines Kindes zweier Lp (a -) Eltern als Lp (a +) bestimmt. Entweder handelt es sich um einen Fall von Illegitimität, oder tatsächlich um eine Ausnahme.

Bei der Unterscheidung in Lp (a +), Lp (as +) und Lp (a -) (Renninger, Wendt, Nawrocki, Weigand 1965) ließen sich die Familienuntersuchungen mit der Hypothese von drei Allelen an einem Genort in Übereinstimmung bringen. Stichhaltig beweisen ließ sich diese "Drei-Allelentheorie" jedoch nicht. Auch die Zwillingsuntersuchungen ordnen sich in die bisherige Vorstellung vom Erbgang des Lp-Systems ein.

Die ersten Resultate des Lp-Testes innerhalb erbbiologischer Gutachten konnten durch die Blutgruppenbestimmungen und die Ergebnisse weiterer erbbiologischer Untersuchungen bestätigt werden. Es fand sich kein Lp-Ausschluß, der den sonstigen Befunden widersprach.

Dennoch ist aufgrund der oben aufgeführten Schwierigkeiten an eine Verwendung des Lp-Systems in Vaterschaftsgutachten vorläufig noch nicht zu denken.

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß Bundschuh in drei verschiedenen Arbeiten über einen Teilfaktor, das sogenannte Lp (ax) berichtet, (1964 und 1965) Mit Hilfe eines Lp-Antiserums, das über die Immunisierung eines Pferdes gewonnen wurde, ließen sich bei einigen Lp (a+) Seren ein weiteres Präzipitat nachweisen. Diese Befunde haben sich noch nicht bestätigen und analysieren lassen (Rittner 1965, W. Renninger, G.G. Wendt, P. Nawrocki und H. Weigand).

II. Fragestellung

K. Berg arbeitete von Juni bis Dezember 1963 im Institut für Human-genetik der Philipps-Universität Marburg.

In dieser Zeit wurde ich von ihm in die Problematik des Lp-Systems eingeführt.

Anschließend erhielt ich von Wendt und Berg die Aufgabe, Untersuchungen zur Methodik des Lp-Systems unter besonderer Berücksichtigung folgender Punkte durchzuführen :

1. Herstellung eines Lp-Antiserums, Immunisierung und Absorption.
2. Die Prüfung des Antiserums und der Bestimmungstechnik des Lp(a)- Faktors.
3. Untersuchungen zur Genfrequenz.
4. Untersuchungen an Familienmaterial zur Frage der Vererbung.

Die im folgenden beschriebenen Versuche und Untersuchungen wurden vom Ende 1963 bis Ende 1964 durchgeführt.

B. Material und Technik

a) Serummateriel :

Für meine Untersuchungen habe ich Blutproben von 12 Familien mit insgesamt 53 Kindern teils aus der Umgebung von Marburg, teils aus der Umgebung von Hann.Münden erhalten.

Außerdem sammelte ich 100 Seren aus einem klinischen Labor in Aachen, und 100 Seren aus einer Blutbank ebenfalls in Aachen.

b) Blutgewinnung und Aufbereitung :

Alle Blutproben sind aus der Vena cubiti entnommen und möglichst schonend nach den Anweisungen von Berg aufbereitet worden. Die aufgefangenen Blute wurden 1 Stunde bei 37°C , anschließend über Nacht bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufgehoben. Diese Maßnahmen sollen die Ausbildung und Retraktion des Fibrinnetzes begünstigen und die Trennung von Serum und Blutkuchen schonend fördern. Das überstehende Serum wurde abgepettiert, 10 Minuten bei ca. 3000 U/Minute zentrifugiert, in kleinen Portionen abgefüllt und bei -25°C eingefroren.

c) Immunisierungsmateriel :

Als Immunisierungsmateriel wurde ein menschliches Vollserum verwendet, in dem sich der Lp (a) - Faktor in besonders klarer Form gezeigt hatte.

d) Tiere für die Immunisierung :

5 Kaninchen für das Immunisierungsprogramm waren sechs Monate alt und wogen durchschnittlich 2,5 kg.

e) Immunisierungskäfig :

Die Kaninchen wurden zur Injektion des antigenen Serums in einen Käfig gesetzt, der auch den Kopf des Tieres fixiert (siehe Abb. 3, Hersteller dieses Käfigs: Firma Kobe, Marburg).

f) Lampe mit Drahtkorb :

Die Injektion des Antigens und die Blutentnahme erleichterte eine von mir entwickelte, sehr einfache Apparatur; eine Glühbirne in Kerzenform (25 W), geschützt durch einen Drahtkorb, wird unter das Ohr des jeweiligen Kaninchens geschoben.

Ein vorgeschalteter Widerstand erlaubt es, Wärmewirkung und Leuchtkraft so zu kombinieren, daß zugleich mit einer starken Hyperämisierung die Gefäße im durchscheinenden Licht deutlich sichtbar werden.

g) Glasplatten für die Ouchterlonyplatten :

Menzel-Dia-Gläser, Kantenlänge 5 cm erwiesen sich als besonders geeignet. Sie werden gereinigt geliefert, müssen jedoch vor der Verwendung nochmals gesäubert werden.

h) Herstellung des Vorrats-Agar :

5 g Reinagar (Behringwerke, Marburg, Op. -Nr.) wurden in 250 ml aqua dest. gelöst, nach 20 Minuten in kochendem Wasserbad soweit erhitzt, daß eine klare Flüssigkeit entstand. In geeigneten Portionen (z. B.: 13 ml, diese Menge reicht für 10 Agarplatten) abgefüllt, blieb dieser nunmehr 2 % Vorratsagar bei $+4^{\circ}\text{C}$ zur Aufbewahrung im Kühlschrank.

i) Natriumphosphat-Puffer :

1600 ml aqua dest.

400 ml eines 0,15 m Natriumphosphat-Puffers pH = 7,0



400 mg Merthiolat (als Bakteriostatikum)

32,4 g NaCl für Analyse.

j) Herstellung der Agarplatten :

Vorratsagar und Agarpuffermischung werden im kochenden Wasserbad getrennt wiederum soweit erhitzt, daß der Agar wasserklar und flüssig wird. Beide Lösungen werden zu gleichen Teilen zusammengegossen. Es entsteht eine 1% Agarlösung. Je 2,5 ml mit einer Pipette aufgebracht, ergeben auf einem Diaglas eine 1 mm dicke Agarschicht. In Petryschalen lassen sich diese fertigen Platten in möglichst feuchtem Milieu bei +4°C einige Tage aufbewahren.

k) Stanzen der Platten :

Unmittelbar vor der Verwendung werden mit einer Stanze, - (mit Absaugvorrichtung für die Wasserstrahlpumpe) -, 7 Löcher von je 4 mm Durchmesser aus dem Agar herausgestanzt. 6 der 7 Löcher sind kreisförmig um das siebente zentral gelegene Loch angeordnet. Der Abstand der Löcher untereinander beträgt 5 mm (siehe Abb. 1 und 2).

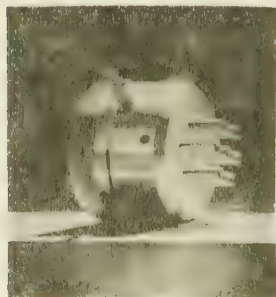


Abb.: 1 Stanze

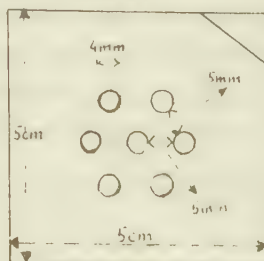


Abb.: 2 : Abmessungen des Dia-glasses und des Stanzmusters.

Die Stanze wird so angesetzt, daß auf zwei Seiten je zwei Löcher parallel zum Rand des Diaglasses liegen. Zur eigenen Orientierung wird zum Schluß eine kleine Ecke des Agar entfernt. Auf diese Weise läßt sich die Reihenfolge der Löcher sicher kennzeichnen.

l) Fixierung der Platten :

Nach der letzten Ablesung werden die Platten in einer Petryschale mit 0,9 % NaCl-Lösung übergossen. Nach 1 - 2 Stunden wird das NaCl gegen aqua dest ausgetauscht, das nach 24 Stunden ebenfalls abgeschüttet wird. Mit einem Filterpapier bedeckt läßt man die Agarschicht eintrocknen.

m) Färbung der Platten :

Als Lipoprotein läßt sich das Lp-Präzipitat mit Ölrot und Sudanschwarz (ohne Glycerinzusatz) gut anfärben.

1. Ölrot-Farblösung:

1 g Ölrot wird in einem Liter 60 % Äthylalkohol gelöst und ca. 48 Stunden bei 55°C gehalten.

Während dieser Zeit wird die Lösung mehrfach geschüttelt.

Färbdauer : bis zu 24 Stunden

Entfärben : in einer 60 % Äthylalkohollösung.

2. Sudanschwarz-Farblösung:

5 g Sudanschwarz werden in einem Liter 60 % Äthylalkohol gelöst. Nach einigen Stunden wird die Lösung filtriert.

Färbdauer : 10 bis 15 Minuten

Entfärben : in einer 60 % Äthylalkohollösung.

n) Fotografische Wiedergabe der Platten :

1. Die Platten können als Nativpräparate fotografiert werden. 2 Tage nachdem sie angesetzt worden sind, werden sie in einem abgedunkelten Raum über einem Lichtkasten, der auch zum Ablesen der Präzipitate dient, mit Hilfe eines Balgengerätes fotografiert.
2. Sudanschwarz gefärbte Platten können als Negative verwendet werden.
3. Die sudanschwarz gefärbten Präzipitate werden projiziert und abfotografiert. Diese Methode ist den beiden ersten überlegen und ermöglicht auch die Wiedergabe sehr schwacher Präzipitate.

C. Gewinnung und Beurteilung eines Lp-Antiserums

I. Immunisierung

In den zur damaligen Zeit vorgelegenen Beschreibungen von Berg lieferte eine gereinigte β -Lipoproteinfraktion die Grundlage zur Immunisierung. Die Gewinnung ist zeitraubend und aufwendig und birgt die Gefahr in sich, daß ein Teil des empfindlichen Proteins denaturiert. Außerdem erhält man keine völlige Reindarstellung der β -Lipoproteinfraktion. Da sich andererseits diese Fraktion durch eine hohe Antigenität auszeichnet, war zu erwarten, daß die Kaninchen in jedem Falle gegen diese Fraktion spezifische Antikörper bilden würden.

Auf Anraten von Berg wurden daher die Kaninchen mit einem bestimmten menschlichen Vollserum vom Typ Lp (a+) immunisiert. Dieses Serum ließ aufgrund seines starken und scharf begrenzten Präzipitates eine

besonders hohe Antigenität vermuten. Die Bestimmung erfolgte mit dem Lp-Antiserum, das von Berg über eine Immunisierung mit einer gereinigten β -Lipoproteinfraktion gewonnen worden war. Rund 200 ml Blut des ausgewählten Spenders wurden in der oben beschriebenen Weise aufbereitet.

Das Immunisierungsprogramm sah vor, jedem Kaninchen innerhalb von vier Wochen 12 ml Vollserum, innerhalb einer jeden Woche an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 1 ml Vollserum über die Vena marginalis des Ohres zu verabreichen.

Voraussetzung für eine saubere Injektion ohne Verletzung der Gefäße, ist die völlige Ruhigstellung des Tieres, insbesondere des Kopfes. Dies ermöglicht der unten abgebildete Käfig (Abb. 3).

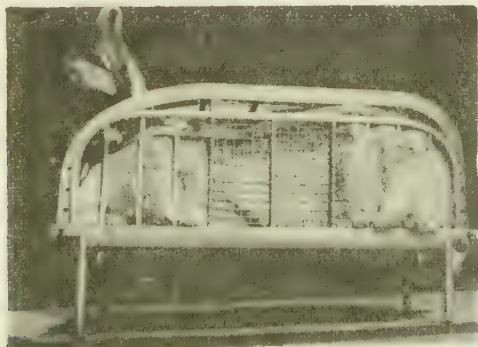


Abb. 3 : Immunisierungskäfig für Kaninchen

Die Gefahr der Immunisierung liegt in der Möglichkeit eines anaphylaktischen Schocks, die mit jeder neuen Boosterung zunimmt.

(Boosterung = wiederholte Immunisierung). Jeweils die erste Injektion einer dreitägigen Boosterung ist besonders gefährlich und muß daher sehr langsam ausgeführt werden. Von der letzten Injektion der vergangenen Boosterung bis zur ersten Injektion der folgenden haben sich Antikörper gebildet, die mit dem neuen Antigen reagieren. Dieser Vorgang kann zu einem anaphylaktischen Schock führen. Die Gefahr wächst mit der Zahl der Boosterungen.

Bei den vorliegenden Versuchen habe ich folgende Beobachtungen gemacht :

1. Woche = Erst-Immunisierung der Kaninchen: keine Reaktion
2. Woche = 1. Boosterung: keine Reaktion
3. Woche = 2. Boosterung: alle Kaninchen begannen nach der ersten Injektion unruhig ihre Nase zu belecken und mit den Pfoten den Kopf zu putzen. (Leck- und Putzreflex). Kaninchen II legte sich bereits auf die Seite (Tachykardie). Die beiden folgenden Injektionen verliefen unauffällig.
4. Woche = 3. Boosterung: Während vier Kaninchen bei der ersten Injektion wieder mit dem Putz- und Leckreflex reagierten, erlag das fünfte Kaninchen K IV in Sekundenschnelle einem anaphylaktischen Schock, der erst 2-3 Minuten nach der Injektion einsetzte.

II. Blutentnahme

Die Blutentnahme begann 8 Tage nach der letzten Injektion der 3. Boosterrung. Ich befolgte zunächst die Angaben von Berg. Mit einer scharfen Rasierklinge wurden jeweils die Vena marginalis des anderen Ohres, das von der Immunisierung verschont geblieben war, angeschnitten. Zudem sorgte die oben beschriebene Lampe für eine starke Hyperämisierung.

Bei diesem Verfahren darf die Vene nicht durchschnitten werden, da sonst die Enden zusammenrollen und die Blutung steht. Als Auffanggefäße dienen schmale Standzylinder (dies ermöglicht eine hohe Serumausbeute). Xylol darf im Gegensatz zur Immunisierung diesmal nicht verwendet werden, anderenfalls läuft das Blut von dem entfetteten Fell diffus über den Hals des Tieres ab.

Um die Blutentnahme zu beschleunigen und gleichzeitig den vorzeitigen Verschuß der Vene zu verhindern, habe ich mehrfach eine zweite Vene medial der marginalis in gleicher Höhe angeschnitten.

Weitaus schneller und erfolgreicher verlief die Blutentnahme aus der Hauptarterie des Ohres mit Hilfe einer Injektionsnadel (Nr. 1). Das Blut floß frei in die Standzylinder. Diesmal konnte die hyperämisierende Wirkung der Lampe wieder durch Xylol verstärkt werden. Das durchfallende Licht erlaubte es, den Verlauf der Gefäße und ihren Füllungs- zustand während der Blutentnahme zu beobachten. Von Zeit zu Zeit kontrahierten sich die Gefäße und erschienen völlig blutleer. In solchen Fällen verschob ich die Blutentnahme auf einen späteren Zeitpunkt.

Nach etwa 50 ml machte sich eine zunehmende Tachykardie, leichte Unruhe und eine verschärfte Atmung bei den Tieren bemerkbar. Nach 60 ml, maximal 65 ml, brach ich die Blutentnahme ab, um die Tiere nicht unnötig zu gefährden.

Tabelle 1 zeigt die Blut- und Serummengen, die sich bei 4 Kaninchen gewinnen ließen.

	K I		K II		K III		K V	
	Blut	Serum	Blut	Serum	Blut	Serum	Blut	Serum
	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml
1. Blutentnahme:	63	32	52	40	54	31	60	34
2. " " :	43	25	5	2	-	-	10	6
3. " " :	-	-	55	38	51	36	62	42
4. " " :	43	17	2	0,5	20	11	-	-
Gesamt mengen:	149	74	114	80,5	125	78	132	82

Tab. 1 : Protokoll der Blutentnahme.

III. Absorption

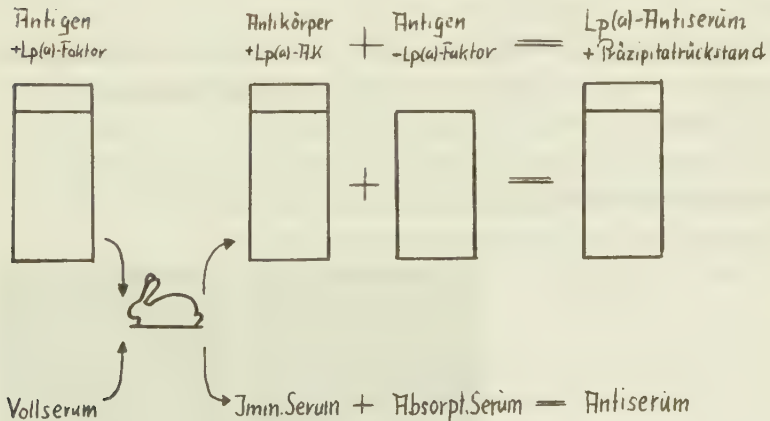
Die Absorption ist der entscheidende Vorgang auf dem Wege zu einem Lp-Antiserum. Die Immunisierung ist mit einem menschlichen Vollserum durchgeführt worden. Daher haben die Kaninchen gegen die meisten Bestandteile dieses Serums entsprechend ihrer Antigenitätswirkung Antikörper gebildet.

Aufgabe der Absorption ist es, alle Antikörper aus dem Immuns serum der Kaninchen herauszupräzipitieren, außer dem Antikörper gegen den Lp(a) - Faktor. Dies kann nur mit einem menschlichen Vollserum geschehen, in dem kein Lp(a) - Faktor vorhanden ist.

Es wurde daher zur Absorption ein eindeutig Lp(a -) Serum ausgewählt.

Bei Absorption mit einem Lp(a+) Serum, die zur Kontrolle durchgeführt wurden, ließen sich alle Antikörper entfernen.

Die folgende Skizze versucht die einzelnen Schritte, die zur Gewinnung des Antiserums führen, schematisch darzustellen.



Skizze : schematische Darstellung der Gewinnung des Lp-Anti-Serums.

In schmalen Reagenzgläsern wurden kleine Portionen Kaninchenimmuns-
serum mit Absorptionsserum in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt.
Ausgehend von einem Verhältnis zu gleichen Teilen, führte einmal die
Erhöhung des Immuns-erumanteiles, das andere Mal die Erhöhung des
Absorptionsserumanteiles zu einer kontinuierlichen Verdünnungsreihe
beider Seren.

Immunserum : Absorptionsserum

usw. /2, 5: 1 / 1, 5:1 / 1:1 / 1:1, 5 / 1:2 / 1:2, 5 / 1:3 / usw.

Zur Abmessung der einzelnen Serummengen eigneten sich graduierte
Pipetten. Treffen die beiden Seren in einem Reagenzglas aufeinander,
so lassen sich dichte Präzipitatschleier beobachten.

Für eine Stunde bleiben die Mischungen einer Temperatur von 37°C
ausgesetzt. Während dieser Zeit ist es nötig, die Gläser mehrfach zu
schütteln, um eine völlige Durchmischung der Seren zu erreichen. Bei
+4°C bilden die Präzipitatschleier über Nacht einen lockeren Boden-
satz. Anschließend wird 10 Minuten bei 3000 U/Minute zentrifugiert.
Das überstehende Serum stellt das Antiserum dar. Es wird in kleinen
Portionen bei -25°C eingefroren (siehe Abb. 4).

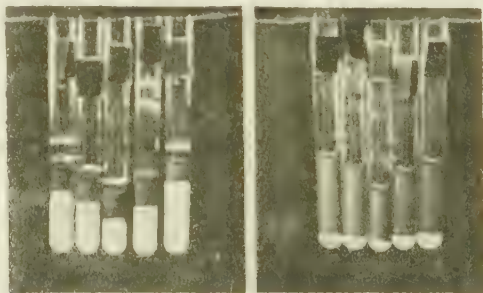


Abb. 4 : Präzipitatniederschläge vor und
nach dem Zentrifugieren.

IV. Beschreibung der angewandten Doppel-Diffusionstechnik nach Ouchterlony

Der Testung der Seren lag die Ouchterlony-Doppeldiffusionstechnik zu Grunde, so wie sie Berg für das Lp-System beschrieben hat (Berg 1963).

Abstände und Durchmesser der Löcher auf den Agarplatten sind so aufeinander abgestimmt, daß die Bestandteile der eingebrachten Seren während der Diffusion entsprechend ihrer Diffusionsgeschwindigkeit ineinanderlaufen.

Das Zusammentreffen von Antigen und Antikörper führt zu einer Reaktion, die in Form milchig weißer sichelförmig oder geschweifter Linien verschiedener Länge und Dichte, der sogenannten Präzipitate, sichtbar wird.

Es besteht nun die Möglichkeit, in beliebiger Variation Antiserum und zu untersuchendes menschliches Serum gegenüberzustellen.

Setzt man das Antiserum in die Mitte, so lassen sich auf einer Platte 6 menschliche Seren in ihrem Lp-Verhalten bestimmen. Nimmt diesen Platz jedoch ein menschliches Serum vom Typ Lp (a+) ein, so lassen sich 6 Absorptionsstufen auf einer Platte in ihrer Reaktionsfähigkeit überprüfen.

V. Test der gewonnenen Lp-Antiseren

Wenn bei der Immunisierung überhaupt Antikörper gebildet worden sind, was nicht immer der Fall sein muß, dann muß in allen Absorptionsstufen ein Lp (a) - Antikörper vorhanden sein.

Dieser muß auf der Ouchterlonyplatte gegen ein Lp (a+) Serum zu einem charakteristischen Präzipitat führen. Das Problem ist nun, diejenige Absorptionsstufe herauszufinden, in der nur der Lp (a) - Antikörper übrigbleibt, und in der alle anderen Antikörper quantitativ ausgefällt sind.

Zu wenig Absorptionsserum würde bedeuten, daß bei der späteren Diffusion auf der Agarplatte gegen ein menschliches Serum die unvollständige Absorption der unspezifischen Antikörper fortgesetzt wird. Folglich müssen neben dem eventuell vorhandenen Lp-Präzipitat eine Reihe unspezifischer Präzipitate sichtbar werden. Es war zu befürchten, daß dabei das Lp-Präzipitat überdeckt werden würde.

Entsprechend bewirkt ein Überschuß an Absorptionsserum eine Verdünnung, allerdings erst in relativ großen Mengen.

Die Versuchsanordnung war folgende: Die peripheren Löcher nahmen die Absorptionsstufen in kontinuierlicher Reihenfolge auf, das zentrale Loch ein Serum vom Typ Lp (a+). Die Diffusion lief über drei Tage in einer feuchten Kammer bei +37°C. Die Ablesung erfolgte am 1.2. und 3. Tag in einem abgedunkelten Raum über einem Lichtkasten, der indirektes Neonlicht liefert.

Am ersten Tag waren nur schwache, undeutliche Schleier ringförmig um das zentrale Loch zu beobachten, am zweiten Tag ließen sich die Präzipitate deutlich differenzieren, am dritten begannen sie teilweise ineinanderzulaufen. Die Ablesung erfolgte deshalb nach 48 Stunden.

Die von den vier Kaninchen gewonnenen Antiseren lieferten in den meisten Absorptionsstufen Präzipitate, die sich nach Form und Lage sehr ähnlich waren. Sie unterschieden sich hauptsächlich in ihrer Dichte. Dabei hängt die Dichte der Präzipitate nicht nur von der Absorptionsstufe ab. Sie ist auch von Kaninchen zu Kaninchen verschieden.

Entscheidend ist nun folgender Vergleich. Auf zwei Ouchterlonyplatten wird in die peripheren Löcher eine übereinstimmende Folge von Absorptionsstufen eingefüllt. In das zentrale Loch kommt in einem Fall ein Lp (a+) Serum, im anderen ein Lp (a-) Serum.

Alle diejenigen Präzipitate, die auf beiden Platten übereinstimmend auftreten, sind unspezifisch.

Bei dieser Versuchsanordnung ergab sich, daß nur die Kaninchen K II, K III, und K V spezifische Lp-Antikörper gebildet hatten. Das Serum des Kaninchens K I wurde deshalb nicht weiter bearbeitet.

Die unspezifischen Präzipitate waren besonders zahlreich bei jenen Absorptionsstufen zu beobachten, in denen das Immunserum die Menge des Absorptionsserums um ein Vielfaches übertraf.

Im Bereich des Verhältnisses von 1 : 1 fanden sich nur noch leichte verunreinigende Schleier. Gleichzeitig nahm das Lp-Präzipitat an Deutlichkeit zu. Letzte Verunreinigungen verschwanden bei dem Verhältnis 2 : 3.

Damit war die Freistellung des spezifischen Lp-Antikörpers gelungen. Absorptionsstufen, deren Mischung stark zu Gunsten des Absorptionsserums verschoben war, zeigten wie erwartet schwächere Lp-Präzipitate als Folge der Verdünnung.

Daraus ließ sich entnehmen, daß das Verhältnis 2:3 gerade jene Mischung war, bei der alle unspezifischen Antikörper eliminiert, gleichzeitig aber noch kein Verdünnungseffekt eingetreten war. Fotografisch läßt sich die eben beschriebene Methode zur Feststellung der optimalen Absorptionsstufe nur schwer demonstrieren.

Ich habe in der Abbildung 5 die Methode insofern abgewandelt, als ich in eines der peripheren Löcher, nämlich Nr. 4, dasselbe Lp(a+) Serum eingefüllt habe, daß auch das zentrale Loch enthält.

Auf diese Weise wird die kreisförmige Anordnung der Präzipitate unterbrochen. Die Absorptionsstufen sind von Loch 5 bis Loch 3 nach steigender Menge Absorptionsserum geordnet.

Loch 2 enthält die optimale Stufe 2:3.

Die Abb. 5 läßt deutlich erkennen, wie bei der Absorptionsstufe in Loch 1 die unspezifischen Präzipitate aufgefächert werden und verschwinden.



Abb. 5 : Test der Absorptionsstufen des Lp-Antiserums gegen ein menschliches Serum vom Typ Lp(a+).

a) Beschreibung einer abgewandelten Testmethode:

In Abänderung der von Berg angewandten Diffusionstechnik, habe ich eine einfachere und instruktivere Methode entwickelt. Die Agarplatte der Abbildung 6 zeigt fünf Reihen zu je fünf Löchern von 1 mm Durchmesser, die mit einer einfachen Pipette herausgesaugt werden. Der Abstand der Löcher untereinander beträgt wiederum 5 mm, ebenso der Reihenabstand. Der Diffusionsweg ist also gleich geblieben.

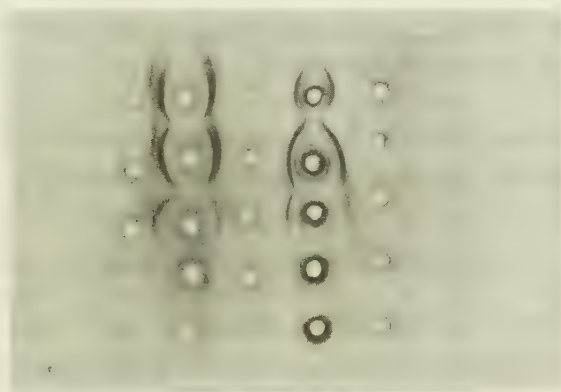


Abb. 6: Agarplatte mit fünf Reihen zu je fünf Löchern. Die Reihen 1, 3 und 5 sind übereinstimmend mit den Absorptionsstufen eines Lp-Antiserums gefüllt, wobei die Menge des Absorptionsserums von oben nach unten zunimmt. Reihe 2 enthält ein Lp(a -), Reihe 4 ein Lp(a +) Serum.

Die Löcher der 2. Reihe füllt ein Lp (a -) Serum, die der 4. Reihe ein Serum vom Typ Lp (a +). Die Absorptionsstufen eines Lp-Antiserums nehmen die Löcher der Reihen 1, 3 und 5, in übereinstimmender Reihenfolge auf, wobei die Konzentration des Absorptionsserums von oben nach unten zunimmt.

Bei dieser Versuchsanordnung läßt sich besonders deutlich der Absorptionsgrad der einzelnen Mischungen feststellen. Während die unspezifischen Präzipitate gleichzeitig auf beiden Seiten, sowohl gegenüber dem Lp (a -) als auch dem Lp (a +) Serum an einem kritischen Punkt verschwinden, bleibt das zusätzliche Präzipitat, das Lp-Präzipitat nur gegenüber dem Lp (a +) Serum enthalten.

An dieser Stelle ist das spezifische Präzipitat des Lp (a) - Faktors freigestellt, die optimale Absorptionsstufe liegt fest.

b) Vorteile der abgewandelten Testmethode der Lp-Antiseren :

1. Fünf Absorptionsstufen können auf einer Platte nicht nur gegen ein positives, sondern auch gegen ein negatives Serum geprüft werden.
2. Die Präzipitate laufen nicht ringförmig ineinander. Dadurch wird die Ablesung und Differenzierung erleichtert.
3. Form, Dichte, Länge und Lage eines Präzipitates lassen sich auf einer Platte mehrfach kontrollieren und vergleichen.
4. Genaue Bestimmung der optimalen Absorptionsstufe.
5. Geringer Serumverbrauch.

c) Beurteilung der gewonnenen Lp-Antiseren; Vergleich mit dem Lp-Antiserum von Berg :

Für weitere Untersuchungen erwies sich das Lp-Antiserum, das mit dem Immunserum des Kaninchens K II gewonnen worden war, als geeignet.

Die Lp (a) - Antikörpertiter der Immunseren der Kaninchen K III und K V waren so gering, daß die Lp-Präzipitate nur schwer reproduziert werden konnten.

Wiederholte Absorptionsversuche mit verschiedenen Lp (a -) Seren und Blindversuche, die Berg in Norwegen durchführte, bestätigten immer wieder für das Immunserum von K II das Verhältnis 2 : 3.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen einer Lp-Untersuchung, die Berg an einem Serummaterial mit einem Lp-Antiserum durchgeführt hatte, das über eine gereinigte β -Lipoproteinfraktion gewonnen war, ergab volle Übereinstimmung.

Lediglich der Antikörpertiter des Lp-Antiserums von K II schien im Vergleich zu dem Lp-Antiserum von Berg niedriger zu sein. Die Lp-Präzipitate des Antiserums von K II zeigten eine geringe Dichte. Bei wiederholten Absorptionen mit dem Rest des eingefrorenen Absorptionsserums, wurden die Lp-Präzipitate immer schwächer.

Ich absorbierte daher nurmehr mit frisch aufbereiteten Seren.

In jedem Falle jedoch blieben die Lp-Antiseren "schwächer" als das Antiserum von Berg. Aus diesem Grunde entschloß ich mich zu einer neuen Immunisierung.

VI. Wiederholte Immunisierung zur Verbesserung des Lp-Antiserums

In der Annahme, bei den alten Kaninchen möglicherweise den Lp-Antikörpertiter zu erhöhen und unter neuen Kaninchen zufällig einen besseren Antikörperbildner zu finden, begann ich sogleich mit einem neuen Immunisierungsprogramm.

a) Immunisierung :

K II, K III, K V und zwei neue Kaninchen, darunter ein Albino, K VI und K VII (Gewicht: 2,5 kg) erhielten wie bei der ersten Immunisierung unter den gleichen Bedingungen die gleichen Serummengen.

Abstand von der ersten Immunisierung : 2 Monate.

Die beiden neuen Kaninchen zeigten das gleiche Verhalten, wie ich es schon früher beobachtet hatte, während die alten Kaninchen schon nach der ersten Injektion der ersten Woche stark reagierten. Dies ließ darauf schließen, daß der Antikörpertiter von der letzten Immunisierung her noch relativ hoch sein mußte.

b) Blutentnahme :

Zu Beginn der ersten Boosterung reagierte K II so stark, daß ich diesem Tier schon eine Woche nach der ersten Boosterung Blut entnahm. An der 3. Boosterung waren dann wieder alle Kaninchen beteiligt. 8 Tage später fand an zwei aufeinanderfolgenden Tagen die Blutentnahme statt. Eine dritte entfiel, da bereits eine sichtbare Verdünnung des Blutes eingetreten war.

Das Albino zeigte sich außerordentlich empfindlich, sodaß es nicht gelang, eine größere Blutmenge zu gewinnen. Es wurde nicht weiter berücksichtigt.

c) Absorption :

Die Aufbereitung beider Seren, sowohl des Immunserums als auch des Absorptionsserums, ließ sich zeitlich so einrichten, daß unmittelbar anschließend die Mischung stattfinden konnte.

Wie diese Versuche zeigten, scheint es ratsam, die Aufbereitung der Seren soweit abzukürzen wie möglich. Die Trennung von Serum und Blutkuchen bei $+4^{\circ}\text{C}$ ist bereits nach einigen Stunden vollzogen.

Ein Vergleich mit Lp-Antiseren, bei deren Gewinnung gealterte Seren verwandt worden waren, liegt die Vermutung nahe, daß die Absorption umso günstiger ausfällt, je frischer die Seren verwendet werden.

d) Test der neuen Immunseren und ihre Beurteilung :

Für das Immunserum von K II bestätigte sich erneut das Verhältnis von 2:3 als geeignete Absorptionsstufe. Das absorbierte Immunserum der zweiten Blutentnahme nach der Reimmunisierung von K II lieferte die bisher stärksten Lp-Präzipitate (siehe Abb. 7).

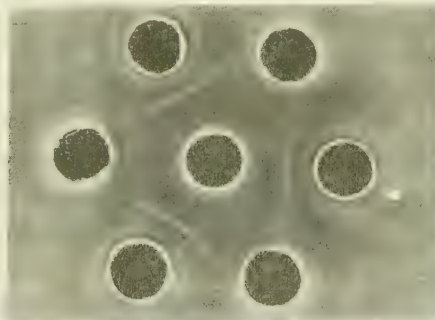


Abb. 7 . Agarplatte mit drei Seren vom Typ Lp(a+).
In der Mitte Lp-Antiserum von K II (2:3) absorbiert. (Nativ-Präp).

Aus diesem Grunde wurde mit diesem Immunserum eine größere Menge Lp-Antiserum hergestellt und bei -25°C zu je 1 ml eingefroren.

Die Immunseren der Kaninchen K III und K V zeigten ebenfalls eine Steigerung gegenüber der ersten Immunisierung (optimale Absorptionsstufe : 2 : 3).

Auch für das neue Kaninchen galt das Verhältnis 2 : 3. Die Lp-Präzipitate waren denen der ersten Immunisierung von K II vergleichbar.

Daraus ist zu entnehmen, daß im vorliegenden Fall eine wiederholte Immunisierung zu einer Erhöhung des Antikörpertiters geführt hat.

Dies steht im Widerspruch zu Erfahrungen von Berg (1965 a). Berg konnte nach einer Reimmunisierung im Abstand von 2 und 6 Monaten bei einigen Tieren keine Erhöhung des Antikörpertiters feststellen.

Allerdings hatte Berg nur über eine Woche reimmunisiert, während ich ein volles Immunisierungsprogramm von vier Wochen durchgeführt habe.

D. Einzelheiten über das Verhalten des Lp-Präzipitates :

Alle vergleichenden Untersuchungen und Blind-Versuche mit dem neuen Anti-Lp-Serum an einem größeren Serummaterial ergaben volle Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Lp-Antiserums von Berg.

Schon bei den ersten Versuchen hatte sich herausgestellt, daß nicht alle Seren vom Typ Lp (a+) durch ein deutliches gleichmäßig scharfes Präzipitat zu erkennen ist.

Es besteht vielmehr in Konturenschärfe, Länge, Dichte und Lage der Präzipitate eine erhebliche Variationsbreite.

Die verschiedenen Erscheinungsformen des Lp-Präzipitates lassen sich nach meinen Erfahrungen in drei Gruppen unterteilen, wobei eine scharfe Differenzierung der einzelnen Gruppen nicht möglich ist.

I. Beobachtungen der Formvariationen des Lp-Präzipitates :

Gruppe a :

Seren, die einen Tag nach Beginn der Diffusion ein dichtes, etwa 5 mm langes Lp-Präzipitat zeigen. Dieses wird am zweiten Tag meist noch stärker und länger, bis über 1 cm lang. Am 3. Tag hat es seine endgültige Form erreicht, später beginnt es wieder undeutlicher zu werden. Man findet einen freien Raum zwischen dem Präzipitat und dem Rand der ringförmig, exzentrisch nach außen verlagerten Schlieren, die jedes Loch auf der Agarplatte umgeben, das mit einem menschlichen Serum gefüllt ist.

Gruppe b :

Seren, die entweder am ersten, oder am zweiten Tag nach Beginn der Diffusion schwache Präzipitate von geringer Dichte und unscharfen Konturen bilden. Die Trennung vom Auftragsort ist nicht immer vollständig vollzogen. Außerdem sind diese Präzipitate meist kürzer. Sie werden im Verlauf der weiteren Diffusion bis zum dritten Tag zwar noch etwas stärker, jedoch bleibt ein deutlicher Unterschied zu denen der Gruppe a.

Gruppe c :

Seren, die selten am 1. Tag, meist am 2. Tag, in einigen Fällen am 3. Tag nach Beginn der Diffusion vermuten lassen, daß ein ganz schwaches Lp-Präzipitat vorhanden ist. Dieser Verdacht ist nur durch zahlreiche Wiederholungen zu erhärten.

Nach meinen Erfahrungen erscheint mir eine Bestätigung über die
- identical - reaction - unbedingt erforderlich.

a) Identische Reaktion zur Darstellung schwacher Lp-Präzipitate :

Konnten innerhalb der ersten Tage nach Beginn der Diffusion präzipitat-ähnliche Niederschläge an typischer Stelle nicht eindeutig als Lp-Präzipitate identifiziert werden, so folgten mehrere Wiederholungen des Lp-Tests unter zu Hilfenahme der identischen Reaktion :

Versuchsanordnung :

In die benachbarten Löcher des fraglich schwach Lp(a+) Serums wurden zwei Seren der Gruppe a (Lp(a+)) eingefüllt.

Handelte es sich bei dem zu untersuchenden Serum um ein Lp(a+) Serum der Gruppe c, so bogen die Enden der starken Lp-Präzipitate um und flossen mit dem präzipitatähnlichen Schatten zusammen. Damit war das Serum eindeutig als Lp(a+) bestimmt (siehe Abb. 8).

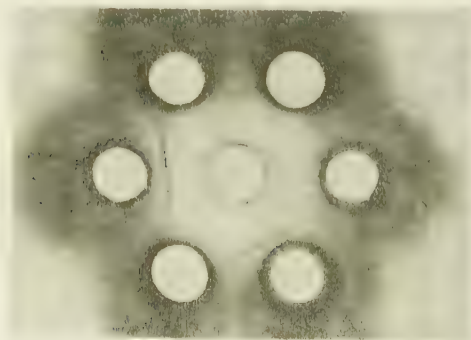


Abb. 8 : Beispiel einer identischen Reaktion zwischen zwei starken und einem schwachen Serum vom Typ Lp(a+).

b) Temperaturänderungen in der feuchten Kammer zur Darstellung schwacher Lp-Präzipitate nach Ouchterlony (1962):

Ouchterlony erwähnt die Möglichkeit, schwache Präzipitate deutlich zur Darstellung zu bringen, indem die Temperatur der feuchten Kammer, in der die Diffusion stattfindet, von $+37^{\circ}$ auf $+4^{\circ}\text{C}$ herabgesetzt wird. Der Vorgang der Diffusion wird durch diese Maßnahme verlangsamt, und die Ausbildung schwacher Präzipitate soll begünstigt werden.

Alle Versuche, die in dieser Richtung unternommen wurden, schlugen fehl. Selbst starke Lp-Präzipitate waren nur schwach und unscharf zu erkennen. Die Diffusion wurde bei $+4^{\circ}\text{C}$ über 8 Tage ausgedehnt und täglich abgelesen.

c) Lp-Test gealterter und verunreinigter Seren :

Schwache Präzipitate waren nach zahlreichen Wiederholungen des Lp-Tests nur sehr schwer oder gar nicht reproduzierbar. Dies zeigte sich besonders deutlich bei der Untersuchung eines größeren Serummaterials, das schon mehrere Monate eingefroren aufgehoben worden war, nachdem bereits einige Bestimmungen wie Gc und Hp durchgeführt worden waren. Ein großer Teil dieser Seren war zusätzlich infiziert oder hämolytisch. Es stellte sich heraus, daß starke Verunreinigungen dieser Art die Durchführung des Lp-Tests unmöglich machen. Bei vielen Seren dieses Materials konnte daher eine einwandfreie Entscheidung zwischen Lp(a+) und Lp(a-) nicht getroffen werden.

Eine Bestimmung des gleichen Materials zwei Wochen später ergab, daß die Mehrzahl der schwach Lp (a+) Seren auch über die identische Reaktion nicht mehr als positiv bezeichnet werden konnten. Starke Präzipitate ließen sich beliebig oft reproduzieren,

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich in Übereinstimmung mit Berg und Mohr (1963) und Berg (1964 c), daß offensichtlich Alterungsvorgänge und Verunreinigungen der Seren die Durchführung des Lp-Testes soweit beeinflussen, daß die Darstellung der Lp-Präzipitate schwach positiver Seren in Frage gestellt ist.

Aus diesem Grunde scheint besonders wichtig zu sein, Hämolyse und bakterielle Verunreinigung der Seren zu vermeiden und die Bestimmung möglichst bald durchzuführen.

II. Seltene Beobachtungen

Unter dem gesamten Serummaterial fanden sich vier Seren, die zunächst negativ erschienen, aber nach mehrfacher Bestimmung über die identische Reaktion in drei Fällen ein schwaches Lp-Präzipitat der Gruppe c zeigten.

In einem Fall nahm die Dichte und Länge des Präzipitates mit jeder Wiederholung des Lp-Tests zu, bis schließlich ein reproduzierbares Präzipitat der Gruppe a erschien. Dieses Serum war völlig frisch, allerdings leicht lipämisch.

Weiterhin gelangten einige Seren zur Beobachtung, die am 1. Tag nach Beginn der Diffusion ein schwaches Präzipitat der Gruppe b vorwiesen, das sich aber schon nach dem 2. Tag, spätestens nach dem 3. Tag wieder aufgelöst hatte.

III. Definition der Grenze zwischen $Lp(a+)$ und $Lp(a-)$

Aus den vorliegenden Ergebnissen geht hervor, daß es zwar relativ einfach ist, ein Serum als $Lp(a+)$ zu identifizieren, sobald man ein charakteristisches Präzipitat an vorgesehener Stelle findet, daß es aber andererseits oft wiederholter und genauester Untersuchungen bedarf, um einzelne Seren als $Lp(a-)$ zu bezeichnen.

Nach Angaben von Berg und Mohr (1963) liegen auch sehr schwache Präzipitate immer noch oberhalb der Sichtbarkeitsgrenze.

Das Phänomen der identischen Reaktion hat jedoch gezeigt, daß in einigen Fällen erst das Umbiegen und Zusammenfließen der Präzipitatenden benachbarter starker Lp -Präzipitate mit dem fraglichen Präzipitatschaten es ermöglichen, jenes Serum eindeutig als $Lp(a+)$ zu bezeichnen.

Die identische Reaktion ist also teilweise bereits eine Maßnahme, um die Sichtbarkeitsgrenze hinauszuschieben.

Mehrfach konnte ich beobachten, daß die Enden zweier starker Lp -Präzipitate zur Peripherie eines zwischen ihnen liegenden Serums umbogen, in Form einer identischen Reaktion, ohne daß bei diesem Serum irgendeine Präzipitatlinie festgestellt werden konnte. Nach dem bisherigen Verfahren des Lp -Tests muß dieses Serum als $Lp(a-)$ bezeichnet werden (siehe Abb. 9 und 10).

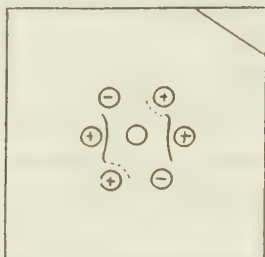


Abb. 9 : zwei identische Reaktionen, die 2 Lp(a+) Seren identifizieren.

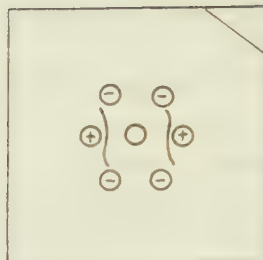


Abb. 10 : zwei starke Präzipitate, von denen je ein Ende in Form einer identischen Reaktion abbiegen.

Es liegt allerdings kein zwingender Grund vor, nicht anzunehmen, daß eventuell auch in diesem Falle eine identische Reaktion vorliegt, und damit ein Serum vom Typ Lp(a+), dessen Lp(a)-Faktor lediglich zu schwach ist, auf diesem Wege sichtbar zu werden.

Diese Vermutung läßt sich experimentell vorerst nicht erhärten.

E. Untersuchungen zur Häufigkeit des Phänotypen
Lp (a+) und Berechnung der Genfrequenz

200 Seren nicht blutsverwandter erwachsener Personen wurden auf Lp(a+) getestet. Von diesen 200 Seren entstammen 100 einer medizinischen Klinik und 100 Seren einer Blutbank.

Die Seren waren weder hämolytisch noch lipämisch oder infiziert. Sie wurden alle in gleicher Weise aufbereitet und bei -25°C eingefroren, da die Lp-Bestimmung erst 2 Monate später durchgeführt werden konnte.

Nach den Angaben von Berg (1964 c) wird in diesem Zeitraum der Lp-Faktor noch nicht beeinträchtigt.

Der Lp-Test wurde durchschnittlich dreimal wiederholt. Die Wiederholungen galten besonders den schwachen Lp(a+) Seren.

In allen Fällen konnte die Unterscheidung in Lp(a+) und Lp(a-) mit Hilfe der identischen Reaktion gesichert werden.

Da zwischen den Geschlechtern keine Unterschiede festgestellt werden konnten, sind im folgenden die beiden Geschlechter zusammen dargestellt.

Die Untersuchung der 200 Seren ergab folgende Werte :

89	Seren Lp(a+)	=	44,5 %
111	Seren Lp(a-)	=	55,5 %
200	Seren	=	100,0 %

Schon im ersten Durchgang des Lp-Tests fiel bei den ersten 100 Seren (aus der Mediz. Klinik) eine ungewöhnliche Häufung der Lp-Präzipitate auf, während die Anzahl der Lp-Präzipitate bei den gesunden Seren (Blutbank) der Erwartung entsprach.

Deshalb werden nachfolgend die Seren der 100 Kranken und 100 gesunden Personen getrennt behandelt.

a) Seren gesunder Blutspender :

$$N = 100$$

$$Lp(a+) = 33.0 \%$$

$$Lp(a-) = 67.0 \%$$

$$\text{Genfrequenz für } Lp^a : 1 - Lp^{\dagger} = 0.1850$$

$$\text{Genfrequenz für } Lp^{\dagger} : (Lp(a-)) = 0.8195$$

b) Seren von Klinikspatienten :

$$N = 100$$

$$Lp(a+) = 55.0 \%$$

$$Lp(a-) = 45.0 \%$$

$$\text{Genfrequenz für } Lp^a : 1 - Lp^{\dagger} = 0.3350$$

$$\text{Genfrequenz für } Lp^{\dagger} : (Lp(a-)) = 0.6650$$

Der Unterschied in der Lp(a+)-Häufigkeit zwischen den Blutspender- und den Patientenserien ist sehr auffallend. Er läßt sich statistisch mit einem Wert für χ^2 und p darstellen. (χ^2 wurde über das Vierfelderschema ermittelt)

$$\chi^2 = 9,822$$

$$0.005 > p > 0.001$$

Es war nicht möglich, die erhebliche Differenz auf einige oder eine Krankheitsdiagnose zurückzuführen, da unter den 100 Fällen ca. 40 verschiedene Diagnosen vorkommen.

Inzwischen haben die Arbeiten von Jörgensen, Dengler und Popfer (1965) und Renninger, Wendt, Nawrocki und Weigand (1965) bestätigt, daß die Bestimmbarkeit des Lp-Faktors durch verschiedene Krankheiten erheblich nach beiden Seiten beeinflußt werden kann.

Es ist bereits auf die Schwierigkeiten hingewiesen worden, in einzelnen Fällen Seren als Lp (a+) bzw. Lp(a-) zu bestimmen. Nimmt man nun an, daß die Lp-Präzipitate nicht alle oberhalb der Sichtbarkeitsgrenze liegen, so wäre es durchaus denkbar, daß sowohl quantitative als auch qualitative Veränderungen im Spektrum der Serumproteine, bisher unsichtbare Lp-Präzipitate in Erscheinung treten lassen.

Abschließend werden in Tabelle 2 alle bisher gewonnenen Ergebnisse zu Bestimmung der Phänotypenhäufigkeit von Lp (a+) gegenübergestellt.

Material	Anzahl der Seren	Lp (a+)	Lp (a -)	Autoren
		%	%	
Norweger	314	34.1	65.9	Berg (1963)
Deutsche	301	32.6	67.4	Berg u. Wendt (1964)
Österreicher	310	31.3	68.7	Berg, Kahlich-Koenner, Weipel (1965)
Deutsche	1030	29.8	70.2	Renninger, Wendt, Nawrocki, Weigand (1965)
Deutsche	683	47,5 ⁺	52.5	Jörgensen, Dengler, Weipel (1965)
Deutsche	100	33.0	67.0	Ergebnisse dieser Arbeit

Tab. 2 : Prozentuale Häufigkeit von Lp (a+) und Lp (a -) in den bisherigen Untersuchungen

⁺) Lp(a+) und Lp(as+) zusammen

F. Familienuntersuchung zur Frage der Vererbung
des Lp (a) - Faktors

Die Seren der einzelnen Familien wurden unter den gleichen Bedingungen
aufbereitet und anschließend sogleich auf Lp (a) getestet.

Familie	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12
Vater	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Mutter	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
1. Kind	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2. Kind	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3. Kind	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4. Kind	+	-	+	-	-			-	-	-	-
5. Kind	+	-	-	-				-			
6. Kind	-	-									

Tab. 3 : Übersicht über 12 Familien und ihr Verhalten in
Bezug auf den Lp(a)-Faktor

Aus Tabelle 3 ist folgendes zu entnehmen :

Unter 12 Familien, deren Verhalten im Lp-System bestimmt wurde
fanden sich :

- 2 Familien : beide Eltern Lp (a+)
- 1 Familie : Vater Lp (a+), Mutter Lp (a-)
- 5 Familien : Vater Lp (a-), Mutter Lp (a+)
- 4 Familien : beide Eltern Lp (a-)

Alle Kinder, die Lp (a+) bestimmt wurden, gehören ausnahmslos Familien an, in denen zumindest ein Elternteil dem Typ Lp (a+) angehört.

Damit widersprachen die Familienuntersuchungen nicht der Annahme einer autosomal-dominanten Vererbung von Lp (a+) gegenüber Lp(a-). Auch die Aufteilung des Materials nach dem Geschlecht in Tabelle 4 steht mit dem angenommenen Erbgang in Einklang.

Vater x Mutter	Anzahl der Familien	♂ Kinder ♀				
		Lp (a+)	Lp (a-)	Lp (a+)	Lp (a-)	
Lp (a+) x Lp (a+)	2	7	-	2	3	12
Lp (a+) x Lp (a-)	1	3	1	1	-	5
Lp (a-) x Lp (a+)	5	4	6	6	3	19
Lp (a-) x Lp (a-)	4	-	13	-	4	17
	12	14	20	9	10	53

Tab. 4 : Übersicht über die untersuchten Familien mit Aufteilung der Kinder in männl. und weibl. Geschlecht.

G. Diskussion

Zahlreiche genetisch determinierte Faktoren gliedern die menschlichen Seren in einzelne Serum-Typen-Systeme. Entsprechende Antiseren ermöglichen es, diese Systeme nachzuweisen und voneinander abzutrennen.

Auf dem Wege einer Immunisierung mit einer isolierten β -Lipoproteinfraktion und der anschließenden Absorption mit geeigneten Seren, war es Berg (1963) gelungen, mit dem Lp (a) - Faktor ein neues erbliches System im menschlichen Serum zu entdecken.

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß auch die Immunisierung mit einem Vollserum vom Typ Lp (a+) zu einem spezifischen Lp (a) - Antikörper führt. Absorption mit Lp (a-) Seren sind in der Lage, diesen Antikörper in Form eines Lp-Antiserums freizustellen.

Die optimale Absorptionsstufe lag für alle Immunseren der einzelnen Versuchstiere bei einem Mischungsverhältnis von 2 : 3.

Auch die Mischungen 2:3, 5 und 2 : 4 lieferten ein brauchbares Lp-Antiserum. Es fand sich jedoch kein Immunserum, dessen optimale Absorption bei 1 : 1 oder 1,5 : 1 lag.

Demnach scheint ein Überschuß an Absorptionsserum notwendig zu sein, um alle unspezifischen Antikörper zu beseitigen.

Zur Beurteilung der einzelnen Absorptionsstufen der Immunseren eignet sich besonders ein von mir entwickeltes Verfahren, bei dem mehrere Absorptionsstufen auf einer Ouchterlonyplatte bei der Diffusion gegen ein Lp (a+) und ein Lp (a-) Serum gleichzeitig beobachtet werden können.

Durch eine Wiederholung der Immunisierung konnte bei drei Kaninchen der Lp-Antikörpertiter erhöht werden. Die Absorption wurde dadurch nicht verändert. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Erfahrungen von Berg (1965 a). Möglicherweise beruht der Unterschied auf der unterschiedlichen Länge der Reimmunisierung.

Die beobachteten Lp-Präzipitate ließen sich in drei Gruppen aufteilen (a, b, c), deren Übergänge fließend sind.

Gruppe a umfaßt alle starken Präzipitate, die bereits nach 24 Stunden sehr deutlich sind und sich durch besondere Dichte und Konturenschärfe auszeichnen.

Unscharfe und transparente Präzipitate, die etwas zögernd zum Vorschein kommen, fallen unter die Gruppe b.

Sehr schwache Präzipitate, die zusätzlich durch die identische Reaktion bestätigt werden müssen, werden zu Gruppe c gerechnet.

Mehrfaches Auftauen und Einfrieren, bakterielle Verunreinigungen und starke Hämolyse stellen die Ergebnisse des Lp-Testes, besonders jener Seren in Frage, deren Lp (a)-Faktor nur in einem schwachen Präzipitat sichtbar wird. Aus diesem Grunde muß auf eine sorgfältige Aufbereitung der zu untersuchenden Seren Wert gelegt werden.

Die Untersuchungen von 200 Seren, die sich in 100 pathologische und 100 gesunde Seren aufteilen, ergab eine auffällige Differenz der Phänotypenhäufigkeit Lp (a+). Während das Ergebnis der 100 gesunden Seren mit dem von Berg (1963) und Berg und Wendt (1964) gut übereinstimmte, fiel bei den pathologischen Seren eine ungewöhnliche Häufung des Lp-Präzipitates auf.

Nach den neuesten Ergebnissen von Lp-Bestimmungen an pathologisch veränderten Seren, herrscht die Meinung vor, daß der Lp (a)-Faktor und seine Nachweisbarkeit von quantitativen krankheitsabhängigen Veränderungen der Serumproteine beeinflußt werden kann.

Die Lp-Untersuchung an 12 Familien mit insgesamt 53 Kindern bestätigte die Theorie, daß der Lp (a)-Faktor einem autosomal-dominanten Erbgang folgt. Es wurden keine Ausnahmen beobachtet.

H. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Gewinnung eines Lp-Antiserums über eine Immunisierung mit einem Vollserum vom Typ Lp (a+) und die anschließende Absorbierung mit Lp (a-) Seren beschrieben.

Es folgen Beobachtungen über die Verhaltensweise der Lp-Präzipitate und eine Erörterung der Schwierigkeiten des Lp-Testes.

Untersuchungen zur Genfrequenz an 100 gesunden Seren zeigen Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Berg (1963) und Berg und Wendt (1964). Im Gegensatz dazu wurde unter 100 pathologisch veränderten Seren eine Häufung des Lp-Präzipitates festgestellt.

Die Untersuchung von 12 Familien mit 53 Kindern ergab keinen Widerspruch zu der bisher angenommenen autosomal-dominanten Vererbung von Lp (a+).

LITERATURVERZEICHNIS

- Allison, A.C. u. Blumberg, B.S. : An isoprecipitation reactions distinguishing human serum protein types.
Lancet, I, 634 - 637, 1961.
- Berg, K. : A new serotyping system in man-the Lp-system.
Acta path. et microbiol. scand. 59, 369-382, 1963.
- Berg, K. : Comparative studies on the Lp and Ag serum type system.
Acta path. et microbiol. scand. 62, 276-286, 1964 a.
- Berg, K. : Precipitation reactions in agar gel between albumin and β -lipoprotein of human serums.
Acta path. et microbiol. scand. 62, 287-298, 1964 b
- Berg, K. : Immunochemical studies of the Lp (a) factor.
Acta path. et microbiol. scand. 62, 600-612, 1964 c.
- Berg, K. : Studies on the reaction between Lp (a+) human sera and anti-Lp (a)-sera from rabbits.
- Berg, K. : The production of anti-Lp (a)-sera in rabbits.
Acta path. et microbiol. scand. 63, 127-141, 1965 a
- Berg, K. : Immunochemical studies of anti-Lp (a)-sera.
Acta path. et microbiol. scand. 63, 142-152, 1965 b.
- Berg, K., D.M. Kahlich-Koenner, G. Weipel : Untersuchungen über das Lp-System-Typenhäufigkeit und Antiserenvergleich. Humangenetik 1, 319-321, 1965.

- Berg, K. u. J. Mohr : Genetics of the Lp-System.
Acta genet.statist. med. 13, 349-360, 1963.
- Berg, K. u. G.G. Wendt : Das Lp-System. Herstellung des Antiserums,
Testmethode, Ergebnisse.
Humangenetik 1, 24-30, 1964.
- Blumberg, B.S., Bernanke, D. u. A.C. Allison : A human lipoprotein
polymorphism. J.clin.Invest. 41: 1936-1944 (1962).
- Blumberg, B.S., Dray, S. u. J.C. Robinson : Antigen polymorphism of a
low density beta-lipoprotein. Allotyp in human serum
Mature, Lond., 194: 656-658, 1962.
- Bundschuh, G. : Anti-Lp (a, x) vom Pferd.
Ärztl. Lab. 10, 309-316, 1964.
- Bundschuh, G. u. A. Vogt : Die Häufigkeit des Merkmales Lp (x) in der
Berliner Bevölkerung.
Humangenetik 1, 379-382, 1965.
- Cramer, K. : Serum β -Lipoprotein lipids and protein in normal
subjects of different sex and age.
Acta med. Scand., 171, 413-427, 1962.
- Crowle, A.J. : Immunodiffusion;
Academic Press, New York and London, 333 pp.,
1961.
- Giblett, E.R., Kickman, C.G. u. O. Smithies : Serum transferins.
Nature (Lond.), 183, 1589-1590, 1959.
- Grabar, P. u. P. Burtin : Analyse immunoelectrophorétique;
Masson & Cie, Paris, 294 pp., 1960.

- Grabar, P. u. C.A. Williams Jr. : Methode permettant l'étude des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines, Application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta*, 10, 193-194, 1953.
- Grubb, R. u. A.B. Laurell : Hereditary serological human serum groups. *Acta path. microbiol. scand.*, 39, 390-398, 1956.
- Hirschfeld, J. : Immunoelectrophoresis-Procedure and application to the study of group-specific variations in sera. *Sci. Tools*, 7, 18, 1960.
- Hjerten, S. : Calcium phosphate chromatography of normal human serum and of electrophoretically isolated serum proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 31, 216-235, 1959
- Jørgensen, G., Dengler, H. u. U. Hopfer : Untersuchungen des β -Lipoprotein-Systems nach Berg bei Gesunden, Kranken und Schwangeren. *Humangenetik* 5, 379- 1965.
- Jørgensen, G. u. H. Hopfer : Untersuchungen über den Lp-Faktor nach Berg. Homo-Bericht über die Tagung der Deutschen Gesellschaft für Anthropologie und Humangenetik in Freiburg 1965 (im Druck).
- Kahlich-Koenner, D.M. u. G. Weipel : Lp-Typensystem und β -Lipoproteinkonzentration. *Humangenetik* 1, 388-389, 1965.
- Landsteiner, K. u. P. Levin : On individual differences in human blood. *J. exp. Med.*, 47, 757-775, 1928.
- Mohr, J. u. K. Berg : Genetics of the Lp-serum types: Association and linkage relations. *Acta genet. statist. med.* 13, 343-348, 1963.

- Ouchterlony, Ö. : Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.
Progr. Allergy, 5, 1-78, 1958.
- Ouchterlony, Ö. : Diffusion -in-gel methods for immunological
analysis;II Progr. Allergy, vol. 6. pp 30-154
(Karger, Basel/New York 1962)
- Nawrocki, P. : Weitere Untersuchungen zum Lp-System.
Homo-Bericht über die Tagung der Deutschen Ge-
sellschaft für Anthropologie u. Humangenetik in
Freiburg 1965 (im Druck).
- Prokop, O. u. G. Bundschuh : Anti-Lp^a vom Pferd.
Z. klin. Chem. 2, 193-194, 1964.
- Renninger, W. : Das Lp-System, ein neuer erblicher Polymorphis-
mus im menschlichen Serum.
Dtsch. med. Wschr. 89, 2249, 1964.
- Renninger, W., G.G. Wendt, P. Nawrocki u. H. Weigand :
Beitrag zur Problematik des Lp-Systems.
Humangenetik Heft 7, 1966.
- Rittner, H. : Familienuntersuchungen zur Vererbung von Ag(x)
und Lp(x). Homo-Tagungsbericht der Deutschen Ge-
sellschaft für Anthropologie und Humangenetik in
Freiburg 1965 (im Druck).
- Smithies, O. : Zone electrophoresis in starck gels: group variations
in the serum proteins of normal human adults.
Biochem. J., 61, 629-641, 1955.
- Tiselius, A., S.Hjerten u. Levin, P. : Protein chromatography on cal-
cium phosphat columns. Arch. Biochem. 65, 132-155,
1956.

Herrn Professor Dr. G.G. Wendt gilt mein besonderer Dank
für die Überlassung des Themas und die freundliche Beratung
und Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 10.6.1939 wurde ich in Aachen als Sohn des Facharztes für Frauenheilkunde Dr.med. Hans Weigand geboren.

Unsere Stadtwohnung in Aachen wurde 1941 während eines Luftangriffes zerstört. Wir verzogen in einen Vorort von Aachen nach Vaalserquartier. Im Herbst 1944 flohen wir vor den Amerikanern nach Meiningen in Thür. Dort begann ich im Herbst 1945 die Volksschule. Im März 1947 kehrten wir nach Vaalserquartier zurück. Dort beendete ich die Volksschule und besuchte anschließend das humanistische Kaiser-Karls-Gymnasium in Aachen. Nach bestandenem Abitur im Frühjahr 1959 bewarb ich mich mit Erfolg um Zulassung zum Studium des höheren Forstdienstes. Bis zum Frühjahr 1961 leistete ich in Gemünd/Eifel mein praktisches Lehrjahr ab, und studierte zwei Semester Forstwissenschaft an der Universität Göttingen in Hann.Münden.

Im Sommer 1961 begann ich in Marburg mit dem Medizinstudium. Da mir aus dem Forststudium ein Semester angerechnet wurde, konnte ich bereits im gleichen Jahr das Vorphysikum ablegen. Im Sommer 1963 bestand ich die ärztliche Vorprüfung, ebenfalls in Marburg, wo ich im Frühjahr 1967 nach 6 klinischen Semestern das Studium mit dem Staatsexamen beendete.

Meine Universitätslehrer waren die Professoren und Dozenten :

Hann. Münden (Göttingen) :

Achermann, Bartels, Eichhorn, Kertz, Nüsslein, Rittig, Temnitz,
Schimitscheck, Schmucker, Wedepohl, Volkert, Wittich, Zichmann.

Marburg :

Amon, Beckmann, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Brück, Buchholz, Bücher, Cleve, Deicher, Delbrück, Dimroth, Drawert, Exner, Franke, Ganz, Gedigk, Golenhofen, Grebe, Hamm, Hardewig, Hartmann, Hensel, Hermann, Hettler, Heuser, Hildebrand, Hohorst, Jakob, Klingenberg, Knauff, Kunz, Lang, Linneweh, Löhr, Lübbers, Mahr, Mann, Martini, Marx, Mattes, Maurath, Meyer, du Mesnil de Rochemont, Neubauer, Nissing, Oehme, Oehmig, Petry, Poetschke, Rodeck, Salfeld, Sauer, Seidel, Siegert, Siess, Schiff, Schleyer, Schlosser, Schmid, Schmidt, Schmitz, Schwaiger, Stender, Straub, Streicher, Schürmann, Vogell, Vogt, Walcher, Wendt, Würtele.

